

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA JETRE U METABOLIZMU ŽELJEZA – HISTOKEMIJSKO
DOKAZIVANJE ŽELJEZA
ROLE OF THE LIVER IN IRON METABOLISM – HISTOCHEMICAL
IRON IDENTIFICATION

SEMINAR

Marija Hršak

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor : Prof.dr. sc. Gordana Lacković – Venturin

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. APSORPCIJA ŽELJEZA	5
3. TRANSFERIN	7
4. ULOGA JETRE	8
4.1. FERITIN	8
4.2. HEMOSIDERIN	9
4.3. REGULATORNA ULOGA I RECIKLIRANJE	10
4.3.1. RECIKLIRANJE	10
4.3.2. HEPCIDIN	10
5. BOLESTI POVEZANE SA METABOLIZMOM ŽELJEZA	11
5.1. SIDEROPENIČNA ANEMIJA	11
5.2. HEREDITARNA HEMOKROMATOZA	12
5.3. JUVENILNA HEMOKROMATOZA	14
5.4. TRANSFUZIJSKA SIDEROZA	14
5.5. ACERULOPLAZMINEMIJA	14
6. HISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE ŽELJEZA	15
6.1. PERLOVA METODA	15
6.2. TURNBULLOVA METODA	17
6.3. METODA ŽLJEZNIH SULFIDIMA	18
6.4. FLUORESCENTNA HISTOKEMIJA NEHEMSKOG ŽELJEZA	19
7. LITERATURA	21
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY	22

1. UVOD

Željezo je esencijalni element potreban za pravilno funkcioniranje organizma. Nalazi se u sastavu hemoglobina i mioglobina gdje služi za transport kisika, važan je sastojak enzima u staničnim oksidacijskim procesima, sintezi steroidnih hormona i žučnih kiselina, sintezi DNA, metabolizmu lijekova i mnogim drugim reakcijama. No, istodobno može djelovati i kao toksin jer u povećanim količinama potiče stvaranje kisikovih radikala koji oštećuju bitne stanične makromolekule. Zbog tog svojstva razvili su se precizni mehanizmi koji omogućavaju kontrolirano kretanje željeza preko bioloških membrana, te njegovu pravilnu raspodjelu po čitavom organizmu.

Željezo se resobira u cijelom probavnom sustavu, a najviše u duodenumu, dok se prema distalnim dijelovima crijeva apsorpcija smanjuje. Divalentno željezo (Fe^{2+} , fero) se lakše apsorbira od trovalentnog (Fe^{3+} , feri) željeza kojeg uglavnom ima više u prehrani, te su zbog toga potrebni različiti spojevi i strukture koje pomažu u redukciji željeza, feri u fero oblik, za lakšu apsorpciju.

U organizmu najviše se željeza utroši kod eritropoieze, tj. najveći dio ja sastavni dio molekula hemoglobina u eritocitima i to otprilike 75%. Ostalih 25% podijeljeno je između feritina (zalihe željeza pohranjene u jetri) koji zauzima veći dio i ostalih procesa kao što su enzimske reakcije. Jedan mali dio željeza, oko 1 mg, gubi se iz organizma ljuštenjem stanica kože, znojem, mokraćom, fecesom, dok se veće količine mogu izgubiti prilikom krvarenja (npr. menstruacija).

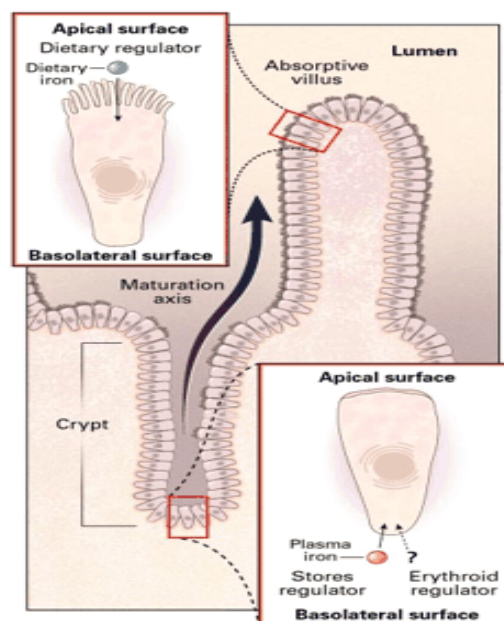
Dnevne potrebe za željezom su mnogo veće nego što organizam dobije apsorpcijom iz hrane (svega 0.1%), stoga postoje mehanizmi koji održavaju konstantnu razinu željeza. Neki od tih su recikliranje željeza pomoću makrofaga i odlaganje željeza u obliku feritina i hemosiderina u stanicama jetre, o čemu će biti riječ kasnije, te ostalim tkivima (npr. mišićno) i organima (npr. slezena).

Sa nedostatkom željeza i njegovim suviškom povezni su različiti poremećaji kao što su različite vrste anemija, hemokromatoze, aceruloplazminemija i druge. Uz to, ono je povezano i sa nastajanjem različitih karcinoma (karcinom jetre i dr.).

Zbog tako velike važnosti željeza za organizam razvile su se i različite tehnike i metode dokazivanja željeza u organizmu. Jedna od najstarijih metoda je Perlova metoda, a ujedno je i najčešća za histokemijsko dokazivanje željeza. Postoje i niz drugih, ne manje važnih, metoda: Turnbull-ova metoda, metoda željeznim sulfidima, te različite mikroskopije: svjetlosna, elektronska, skenirajuća itd.

2. APSORPCIJA ŽELJEZA

Svi sisavci apsorbiraju željezo u dvanaesniku (duodenum) preko epitelnih stanica tankog crijeva koje se nalaze na crijevnim resicama (izdanci sluznice). One povećavaju apsorpcijsku površinu crijeva. Epitelne stanice, tzv. enterociti (Slika 1.), cilindričnog su oblika i na apikalnoj strani imaju mikrovile koji čine četkastu prevlaku u kojoj je smještena većina proteina potrebnih za apsorpciju željeza (Andrews i sur., 2006).

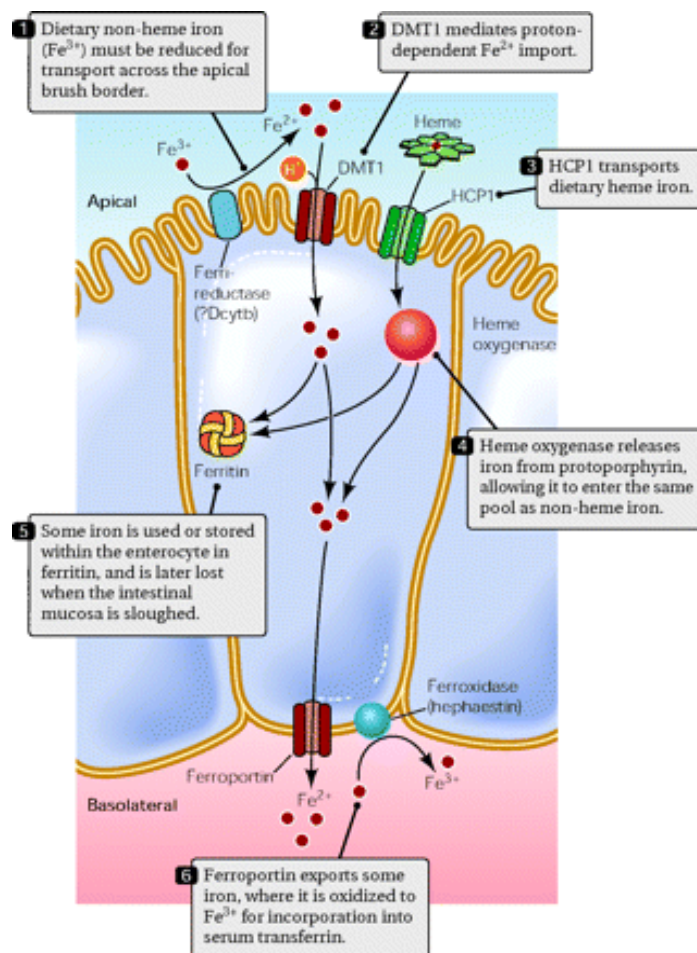


Slika 1. Struktura crijevne resice i enterocita
(Izvor: www.physiologyonline.physiology.org)

Glavni apsorpcijski protein je dvovalentni metalni transporter (DMT1, *divalent metal transporter 1*) sastavljen od 12 transmembranskih regija (Andrews i sur., 2006). Osim željeznih iona, DMT1 može prenositi i ostale dvovalentne ione (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} i Zn^{2+}). Da bi funkcionirao, potreban je niski pH kao izvor H^+ iona za protonski kotransport (simport). Zbog specifičnosti da DMT1 prenosi samo dvovalentne ione, a željezo je u hrani većinom u Fe^{3+} obliku, potreban je još jedan protein, DCTYB (*duodenal cytochrom b*)–ferireduktaza koja reucira Fe^{3+} u Fe^{2+} . Željezo u sastavu hema u stanicu se prenosi preko posebnog

proteinskog nosača HPC1 (*heme carrier protein 1*) u nepromijenjenom obliku, tek u stanici dolazi do izrezivanja iz pofirinskog prstena. To čini enzim hem-oksigenaza 1 (Slika 2.).

Apsorbirano željezo se nakuplja u citoplazmi enterocita u malim količinama i većina iona se odmah dalje prenosi preko bazalne membrane pomoću proteina ferroportina izvan stanice gdje se pomoću proteina hepaestina, vezanog također za bazalnu membranu enterocita, oksidira do Fe^{3+} . Feri ioni se nakon toga vežu za serumski protein transferin koji služi za prijenos željeznih iona u organizmu do ostalih stanica. Dio Fe^{2+} iona zaostalih u enterocitu pohranjuje se u protein feritin, no on se nalazi i u jetri gdje mu je funkcija više izražena.

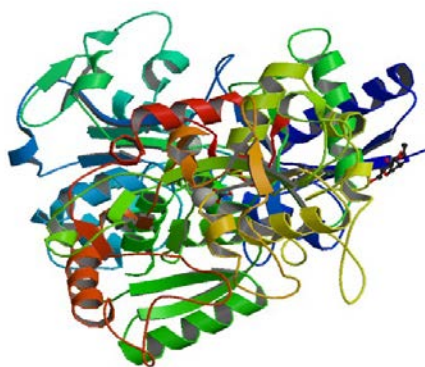


Slika 2. Apsorpcija željeza u crijevu; apsorpcijski proteini (Izvor: www.physiologyonline.physiology.org)

3. TRANSFERIN

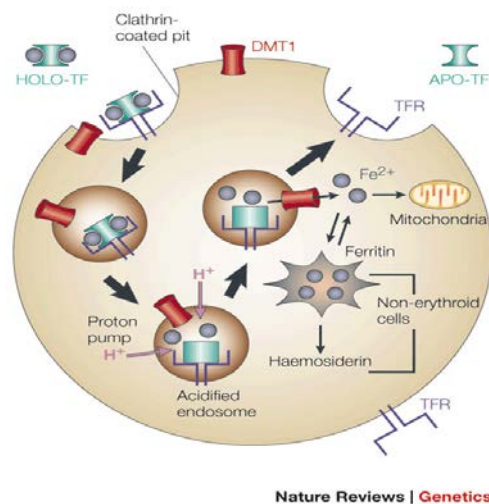
Globulin, koji čvrsto veže ione željeza u neutralnoj ili slabo alkalnoj sredini. Jedna molekula transferina veže 2 atoma trovalentnog željeza (Slika 3.). Molekularna težina mu je oko 90000 i predstavlja 3% svih serumskih proteina i može se u plazmi naći slobodan 2/3 (UIBC) ili u spoju sa željezom 1/3. Funkcija mu je sprečavanje posredovanja željeza u reakcijama nastajanja slobodnih radikala i olakšava transport željeza u stanicu.

Ioni željeza su vezani koordinativnom vezom za tirozinske, aspartatske i histidinske ostatke (Andrews i Schmidt, 2006).



Slika 3. Transferin
(Izvor: www.wiki.symplus.co.jp)

Na stanicama postoje specifični transferinski receptori, TfR1 i TfR2 (Andrews i sur., 2006), koji omogućuju ulazak kompleksa transferin-Fe³⁺ u stanicu. Pri ulasku u stanicu dolazi do invaginacije stanične membrane i stvara se endosom koji se pomoću ATP-protonske pumpe zakiseljuje. To uzrokuje otpuštanje iona iz kompleksa, te redukciju Fe³⁺ u Fe²⁺ (Slika 4.). Fe²⁺ iz endosoma izlazi kroz isti DMT1 kao u enterocitima. Željezni ioni koji nisu odmah upotrijebljeni u reakcijama, skladište se u feritin ili hemosiderin (jetra).



Slika 4. Endocitoza posredovana receptorom
(Izvor: www.nature.com)

4. ULOGA JETRE

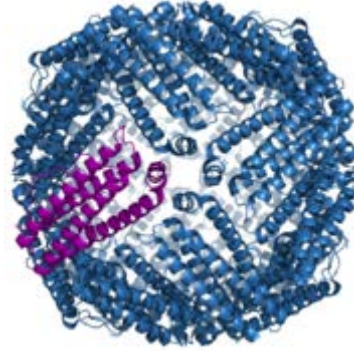
Jetra igra važnu ulogu u održavanju homeostaze željeza jer je najveće skladište željeza u organizmu. Kao i enterociti u duodenumu, hepatociti su sposobni unositi, skladištiti i otpuštati željezne ione. Transportni proteini koji sudjeluju u unosu i izlazu željeza još nisu otkriveni, međutim postoje i neki enzimi koji utječu na otpuštanje željeza iz hepatocita. Najpoznatiji takav enzim je ceruloplazmin, čija je primarna funkcija prijenos bakrenih iona u krvi, no ujedno i pospešuje otpuštanje željeza i njegovo pretvaranje iz feri u fero oblik.

Hepatociti jetre većinom služe kao depo za skladištenje, odlaganje suvišnog željeza.

4.1. FERITIN

Feritin je najvažniji protein za pohranu željeza u tijelu. Najveće koncentracije su nađene u jetri, slezeni i koštanoj srži. Feritin je sferična molekula, koja se sastoji od 24 polipeptidne podjedinice i centralnog dijela, atoma željeza (Slika 5.). Naziv feritin karakterizira ne samo jednu molekulu, nego cijelu seriju raznih izoferitina iz različitih organa. Svima je zajednička konstrukcija poput školjke od 24 virtualno identičnih podjedinica oko šupljine u kojoj je željezo pohranjeno u formi željeznog oksihidrofosfata (Siah i sur., 2006).

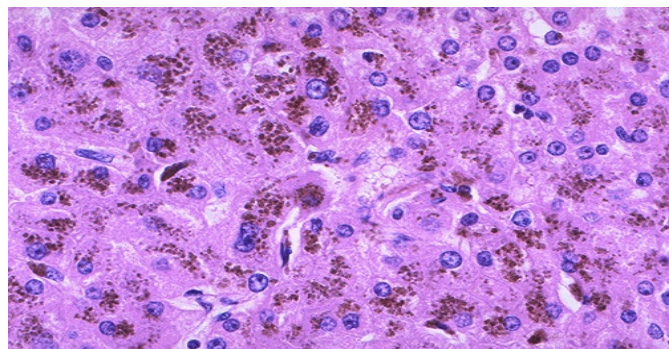
Feritin ima funkciju da pohranjuje željezo u stabilnoj netoksičnoj formi. Forma feritina, koja je neophodna u metabolizmu željeza je bazični isoferitin iz jetre i slezene.



Slika 5. Struktura feritina
(Izvor : www.upload.wikimedia.org)

4.2. HEMOSIDERIN

Drugi oblik skladištenja željeza je hemosiderin. To je kompleks proteina i željeza, koji se može vidjeti pod mikroskopom u obliku zlatnih intracelularnih granula. Konverzija feritina u hemosiderin povećana je kada se povećava količina željeza u tkivu. Dok je feritin raspodijeljen u parenhimalnim stanicama i makrofazima, hemosiderin je prvenstveno deponiran u Kupfferovim stanicama jetre (Slika 6.) i makrofazima slezene i koštane srži. U stanjima preopterećenja željezom jako deponiranje hemosiderina vidi se u jetri i u drugim organima.



Slika 6. Nakupine hemosiderina u hepatocitima i Kupfferovim stanicama
(Izvor: www.library.med.utah.edu)

4.3. REGULATORNA ULOGA I RECIKLIRANJE

Jetra nema samo skladišnu ulogu, već ima i ulogu recikliranja u kojoj sudjeluju makrofazi, te regulatornu ulogu.

4.3.1. RECIKLIRANJE

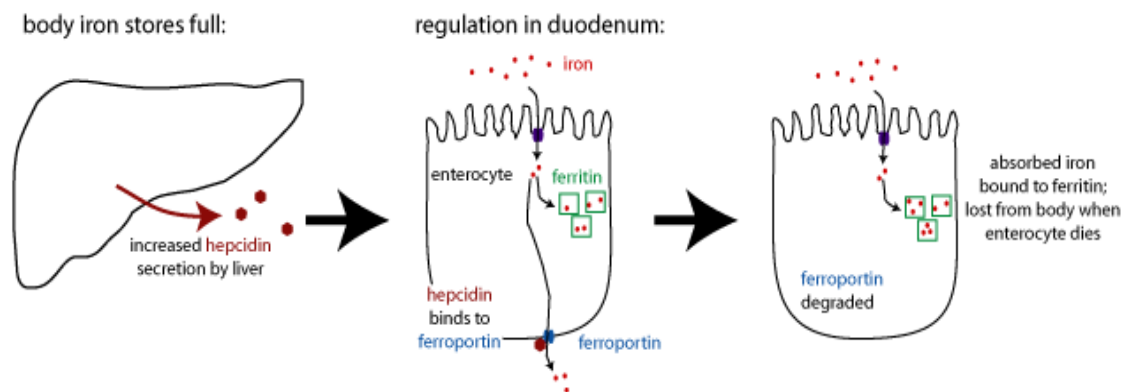
Makrofazi u jetri fagocitiraju stare eritrocite. Dolazi do lize eritrocita iz kojeg se oslobađa hemoglobin. On se katabolizira pomoću hem-oksigenaze što uzrokuje slabljenje veza između željeznih iona i hema i na kraju njegovo otpuštanje (Andrews i sur., 2006). Jedan dio iona se zadržava pohranjen u makrofazima, a drugi se otpušta u serum i veže za transferin koji ga ponovo prenosi do koštane srži gdje se ugrađuje u protoporfirinski prsten (hem) u eritrocitima. Zbog toga se taj ciklus naziva recikliranje. U izlazu željeznih iona iz makrofaga sudjeluju isti proteini kao i kod enterocita.

4.3.2. HEPCIDIN

Smatra se da jetra "osjeća" kolika je koncentracija i potreba organizma za željezom i ima središnju ulogu u regulaciji apsorpcije željeza u duodenumu.

Nedugo je otkriven peptidni hormon koji pomaže u kontroli apsorpcije željeza. Heparin je peptid sastavljen od 20–25 aminokiselina, kojeg proizvode hepatociti kao proteinski pekursor. Nakon što se dodatno obradi, gotov hormon se izlučuje u serum, a možemo ga naći u mokraći kao ekskret. Studije provedene *in vivo* pokazale su da hepcidin ima dvojaku ulogu–negativni je regulator apsorpcije željeza u crijevu i negativno djeluje na otpuštanje željeza pohranjenog u makrofazima. Jedan od predloženih modela djelovanja hepcidina na apsorpciju željeza (Slika 7.) je inhibicija izlaznog proteina feroportina (IREG-1). Dolazi do promjene njegove konformacije i željezo ne može izaći iz enterocita uslijed čega dolazi do prekomjernog nakupljanja željeza (Sharma i sur.,2005). U okolnim enterocitima tada dolazi do stvaranja proteina IRE (*iron responsive enzym*) koji uzrokuje degradaciju DMT1 mRNA te ne dolazi do njezine translacije, što znači smanjenu proizvodnju proteina, a time i smanjenu apsorpciju. U normalnim uvjetima IRE je vezan za IRP (*iron responsive*

protein) protein, no kod nakupljanja željeza on se veže za ione željeza i time omogućava prehodno opisano djelovanje IRE.



Slika 7. Regulacija apsorpcije željeza hepcidinom

(Izvor: www.courses.washington.edu)

Smanjena razina željeza u serumu (npr. uzrokovana teškim krvarenjem), u jetri se održava kao redukcija u saturaciji transferina što dovodi do smanjene proizvodnje hepcidina i povećane apsorpcije u crijevu. Kod različitih upalnih procesa stvaraju se citokini (npr. interleukin-6) koji potiču stvaranje hepcidina (Sharma i sur.,2005). Povećane količine hepcidina djeluju ihibirajuće i na otpuštanje željenih iona iz makrofaga. Kao posljedica se javlja smanjena dostupnost željeznih iona mikroorganizmima koji ga koriste za proliferaciju te se tako smanjuje infekcija. Iako deficit željeza nije dobar za organizam, u svrhu da se spriječi jaka infekcija, on žrtvuje sam sebe.

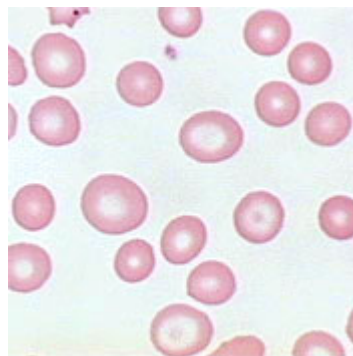
5. BOLESTI POVEZANE SA METABOLIZMOM ŽELJEZA

5.1. SIDEROPENIČNA ANEMIJA

Manjak željeza vrlo je čest u ljudskoj populaciji, osobito u žena reproduktivne dobi. Prema nekim pokazateljima 1/3 do čak 1/5 zdravih žena reproduktivne dobi ima smanjene zalihe željeza, dok 10% ima anemiju uzrokovanu manjkom željeza. Kako je molekula željeza sastavni dio hemoglobina, na koji se u crvenoj krvnoj stanici (eritrocitu) vežu molekule željeza, smanjena količina raspoloživog željeza dovodi do smanjenog stvaranja hemoglobina, a time i do poremećenog stvaranja eritrocita (Andrews i Roy, 2001). Eritrociti bez željeza smanjene su veličine i nazivaju se mikrociti (Slika 8.). Do smanjene količine ukupnog željeza u organizmu može doći zbog sljedećih razloga:

- kroničnog krvarenja
- nedovoljnog unosa željeza putem hrane, osobito u dojenčadi i djece
- poremećaja u apsorpciji željeza iz probavnog sustava
- pojačanog razaranja eritrocita (hemolize) kao posljedica drugih bolesti.

Razne bolesti koje zahvaćaju sluznicu duodenuma utječu na smanjeno prihvaćanje željeza i mogu dovesti do sideropenične anemije. Smanjeni unos željeza prehranom kao uzrok sideropenije čest je samo u dojenčadi i djece. Njihove su potrebe zbog rasta velike, mlijeko predstavlja slab izvor željeza, a u starijih je osim slabijeg unosa željeza prehranom, često važan faktor i postojanje infekcije parazitima te krvarenje iz gastrointestinalnog trakta.



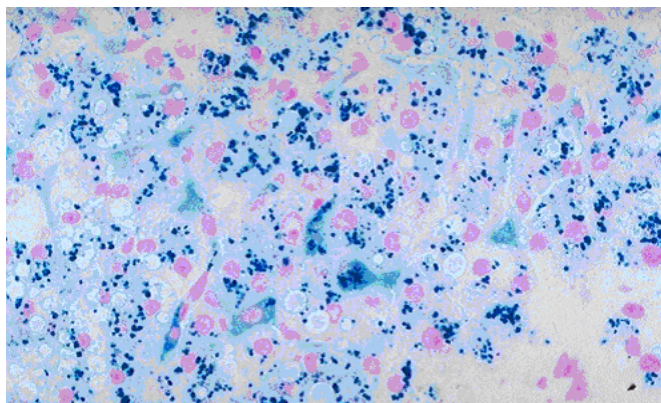
Slika 8. Sideropenična anemija
(Izvor: www.chronolab.com)

5.2. HEREDITARNA HEMOKROMATOZA

Hemokromatoza je autosomno-recesivno nasljedni poremećaj metabolizma željeza, koji je obilježen neprimjereno visokom crijevnom apsorpcijom željeza iako je organizam zasićen tim metalom. Ona je najčešća genska bolest bijele populacije u sjevernoeuropskim zemljama. Javlja se većinom u drugoj polovici života. Iako je HFE-gen podjednako raspoređen među ženama i muškarcima, kod žena se hemokromatoza značajno rjeđe klinički očituje i dijagnosticira vjerojatno zbog gubitka velikih količina željeza za vrijeme menstruacije, porođaja i dojenja.

Gen za hemokromatozu, nazvan HFE, smješten je u kratkom kraku 6. kromosoma. Opisano je više mutacija, a dvije glavne mutacije odgovorne za hemokromatozu su C282Y:C282Y i C282Y:H63D (C282 je zamjena cisteina tirozinom; H63 je supstitucija aspartata histidinom). Osnovni poremećaj u hemokromatozi jest povećana crijevna apsorpcija željeza u odnosu na ukupne zalihe željeza (Andrews i Donovan, 2004). Zbog toga dolazi do značajnog nakupljanja željeza u organizmu, poglavito u jetri. Pretpostavlja se da u hepatocitima dolazi do peroksidacije lipida inducirane željezom, što uzrokuje oštećenje ili smrt hepatocita. Posljedično dolazi do aktivacije Kupfferovih i stelatnih stanica, što rezultira patološkom fibrozom te u konačnici razvojem ciroze jetre.

Željezo se u pravilu nakuplja u periportalnim hepatocitima, a Perlovo berlinsko modriilo rabi se za određivanje i lokalizaciju nakupina željeza (Slika 9.). Preporučuje se za kvantificiranje koncentracije željeza u jetrenom tkivu učiniti CT jetre, MR jetre ili testiranje magnetske osjetljivosti. Inače, kod pacijenata s hemokromatozom i razvijenom cirozom jetre obvezatno je, zbog izrazito visokog rizika od razvoja hepatocelularnog karcinoma, svakih 6 mjeseci učiniti ultrazvučni pregled jetre (Kalauz i Premužić, 2006).



Slika 9. Jetra sa hemokromatozom; plavo – nekupine hemosiderina
(Izvor: www.pathologieutrecht.nl)

5.3. JUVENILNA HEMOKROMATOZA

Juvenilna hemokromatoza (Papanikolaou i Pantopulos, 2004) karakterizirana je kroničnim nakupljenjem željeza u jetri i srcu u ranoj životnoj dobi, te se simptomi javljaju do 30-tih godina života (Chamaschella i sur., 2002). Jednako pogađa oba spola. Postoje 2 razloga zbog kojih dolazi do tog poremećaja. Prvi je povezan sa aktivacijom gena na kratkom kraku 1. kromosoma (Roetto i sur., 1999) te uzrokuje bolest u većini slučajeva. U drugom slučaju dolazi do mutacije gena HAMP za hepcidin (Roetto i sur., 2002) što uzrokuje inhibiciju njegove ekspresije uslijed čega dolazi do povećane apsorpcije željeza i njegovog nakupljanja u tkivima.

5.4. TRANSFUZIJSKA SIDEROZA

Ova bolest spada u sekundarne poremećaje nakupljanja željeza jer nije uzrokovana poremećajima metabolizma, već je posljedica vanjskih utjecaja, u ovom slučaju zbog čestih transfuzija koje se koriste za liječenje pojedinih vrsta anemija (Papanikolaou i Pantopulos, 2004).

Svaki mililitar transfuzijske krvi kojeg primi pacijent organizmu znači dodatan miligram željeza u krvi, međutim organizam i dalje pojačano apsorbira željezo putem gastrointestinalnog trakta. Zbog toga na posljetku dolazi do razvoja suviška željeza koji se primarno nakuplja u retikuloendotelnim makrofazima, a kasnije i u parenhimskim stanicama što uzrokuje oštećenje stanica, a time i tkiva.

5.5. ACERULOPLAZMINEMIJA

Aceruloplazminemija (Papanikolaou i Pantopulos, 2004) je autosomno recesivni poremećaj povezan sa mutacijama u genu za ceruloplazmin, što dovodi do gubitka njegove feroksidazne aktivnosti. Karakterizira ga nakupljanje željeza u mozgu i visceralnim organima (Nittis i Gitlin, 2002). Koncentracije željeza u mozgu kod ovog poremećaja značajno su povećane što uzrokuje oksidativni stres i oštećenje neurona, degeneraciju i apoptozu. Simptomi koji ukazuju na aceruloplazminemiju su degeneracija retine, diabetes mellitus, anemija i neurološki simptomi.

6. HISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE ŽELJEZA

Povijest histokemijskog dokazivanja željeza je vrlo dugačka. Perl (1867) je objavio pionirski rad u tom području. Koristio je kalijev ferocijanid i HCl da bi dokazao željezo u tkivima. Ubrzo nakon toga, Quincke je dokazao željezo u tkivu pomoću amonijevih sulfida (Quincke, 1896). Nakon toga su predstavljeni modeli varijacija tih metoda i neke nove metode, te su testirani. Nešto noviji pregled histokemije je napravio Pearse (1985). Od tada započinje nova era u razvoju metoda; objavljene su nove kombinacije starih metoda ali su i predstavljene inovativne tehnike.

Potreba da se predoči raspodjela željeza u tkivima, posebno stanično željezo i njegovo redoks stanje, iznikla je iz sve većeg razumijevanja metabolizma željeza u fiziološkim i patološkim stanjima kao i napretka u MRI tehnikama koje su to omogućile. Detaljno poznavanje razvoja, promjena i napretka u histokemijskim tehnikama, osnova je za unaprijeđenje i razvoj novih tehnika.

U ovom dijelu biti će opisana Perlova metoda, te još neke manje korištene metode, ali ne i manje važne.

6.1. PERLOVA METODA

Perlova metoda je vrlo stara, no još je i danas najčešće korištena u dokazivanju nehemskog željeza u laboratorijskoj praksi zbog svoje specifičnosti da boji samo željezo, jednostavnosti procedure i jeftina je. Ona ovisi o stvaranju ne topljivog berlinskog modrila (Prussian blue) u dijelu tkiva tretiranim sa HCl-om.

Perl je predstavio berlinsko modrilo kao materijal za dokazivanje željeza u različitim tkivima i organima. Ovu metodu prvi je opisao Grohe (1861) koji je uočio taloženje berlinskog modrila nakon što je tkivo u raspadu, koje je bilo izloženo zraku ili vodenoj otopini dugo vremena, tretirao sa malom količinom otopine kalijevog ferocijanata i HCl-a. No, ni Perl ni Grohe, nisu dali točne informacije o količinama agensa koje su koristili da bi dobili plavi precipitat. Tek kasnije su različiti istraživači došli do pravih koncentracija i količina potrebnih za bojanje. Danas se najčešće koristi Lisonova mješavina od jednakih volumena 2% HCl i 2% kalijevog ferocijanata koja daje nabolje rezultate (Meguro i sur., 2005).

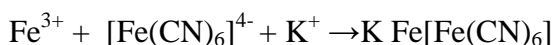
Nehemsko željezo (Fe^{3+}) vezano je u stanici za organske baze, proteine, polarne glave membranskih lipida te nukleotide. Da bi se oslobodilo iz tih komponenti, potrebno je stanicu, sustav tretirati sa kiselinom uslijed čega dolazi do slabljenja veza između željeza i proteina ili neke druge strukture, te se ono oslobađa i reagira sa ferocijanidnim ionom ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) uz pojavu berlinskog modrila.

Reakcija:



Berlinsko modrilo

Ili

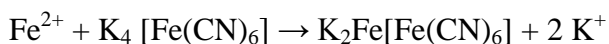


Reakcija je jednostavna. Odvija se između aniona i kationa, što podrazumijeva da je Fe^{3+} slobodan u stanici i dostupan ferocijanidnim ionima. Drugima riječima, ova će se reakcija odvijati samo kada je željezo u ionskom obliku. Turnbull-ova metoda boji divalentno željezo po istom principu.

Berlinsko modrilo je tamno plavi kristalni precipitat. Elektronskom mikroskopijom otkrivena je kubična struktura kristala koji mogu biti pojedinačni ili u nakupinama, te 20-200 nm u promjeru (Parmley i sur., 1978; Meguro i sur., 2005), poglavito u stanicama kao što su makrofazi slezene gdje dolazi do velikog nakupljanja željeza.

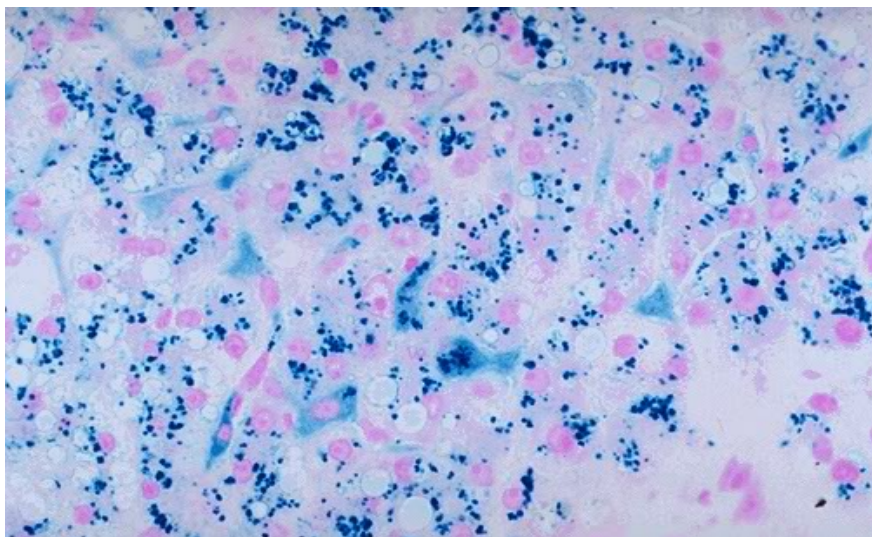
Proteinski sklop feritina može sadržavati i do 4 500 atoma željeza, ali najčešće sadrži tek oko 2000-2500 atoma u većini tkiva. Kada se svi ti atomi oslobode i vežu sa ferocijanidnim ionima, nastaju kristalne strukture dovoljno velike za otkrivanje Perlovom metodom ili elektronskom mikroskopijom (Slika 10.).

U početku se smatralo da se Perlovom metodom mogu samo feri ioni otkriti, no to je opovrgnuto sljedećom reakcijom :



Everitt's salt

U toj reakciji kalijev ferocijanid ($\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$) reagira i sa fero ionima što daje bijeli talog nazvan "Everitt's salt" ili "Prussian white". "Everitt's salt" polako oksidira na zraku ili u vodenoj otopini te poprima plavu boju—nastaje berlinsko modrilo. Time je dokazano da Perlova metoda može obojiti i Fe^{3+} i Fe^{2+} ione (Meguro i sur., 2003).



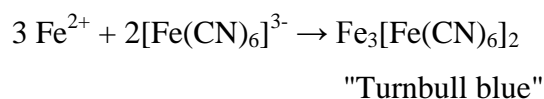
Slika 10. Hepatociti jetre tretirani Perlovom metodom
(Izvor: media.photobucket.com)

6.2. TURNBULL-OVA METODA

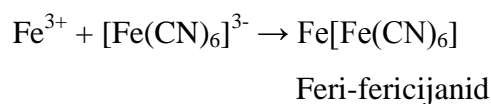
Turnbull-ova metoda (Meguro i sur., 2005) koristi fericijanid umjesto ferocijanida korištenog u Perlovoj metodi. A postupak je isti kao i u Perlovoj metodi. Reakcijom fericijanidnog iona i Fe^{2+} nastaje netopljivi plavi precipitat- "Turnbull blue" (Slika 11.).

Zaleski (1887) je prvi upotrijebio tu metodu u svrhu dokazivanja željeza u tkivu sa idiopatskom trombocitopenijom purpura koristeći otopinu 1% fero- ili fericijanida i 3% HCl. Uočio je pozitivne reakcije na različitim organima, te sive mrlje na dijelovima mozga. "Turnbull blue" se taloži u većim nakupinama nego berlinsko modriilo, te je manje gustoće i ne toliko precizno definiranig oblika. "Turnbull blue" dobije se miješanjem Fe^{2+} i

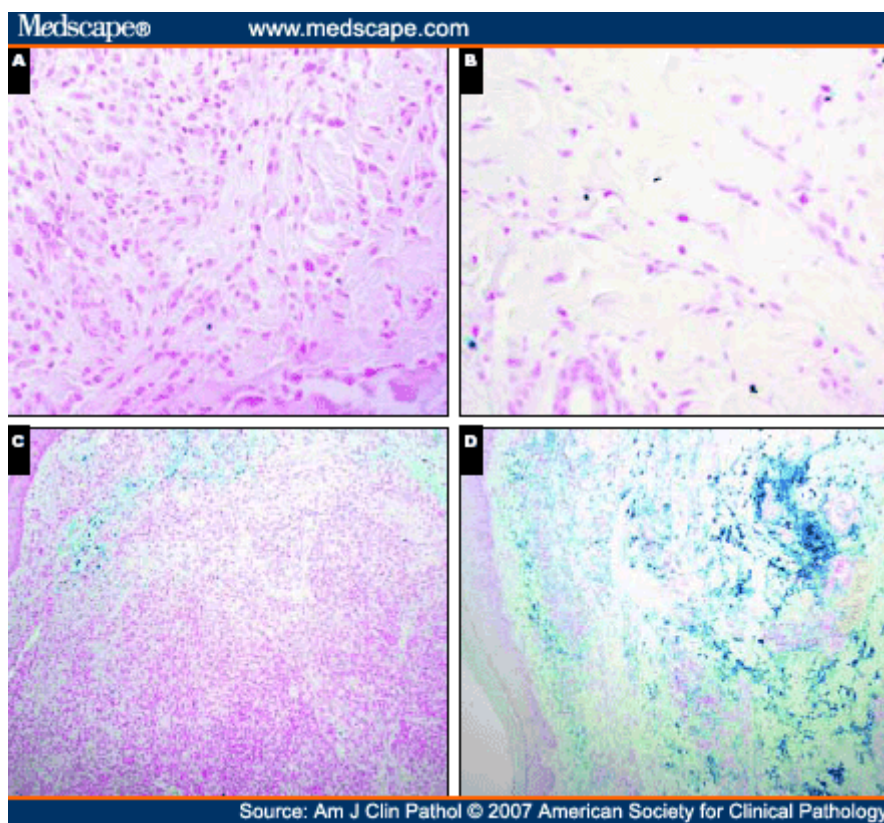
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$:



Kada se $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ pomiješa sa otopinom Fe^{3+} dobije se feri-fericijanid te otopina poprimi smeđu boju jer se taj spoj ne taloži. Feri-fericijanid je jaki oksidans i reagira sa reducirajućim tkivnim agensima kao što su askorbinska kiselina, melanin, lipofuscin i proteinima koji sadrže tiolne skupine.



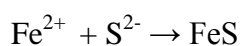
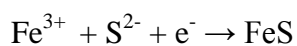
Ova metoda se međutim ne koristi sama već nakon pretretmana uzorka sa $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ (Tirmann-Schmeltzer metoda; Gömöri, 1936) koji reducira nehemsko Fe^{3+} u FeS .



Slika 11. Postupno bojenje tkiva jetre Turnbullovom metodom-slika D: naslage "Turnbull blue" (Izvor: www.medscape.com)

6.3. METODA ŽELJEZIM SULFIDIMA

Metoda željeznim sulfidima (Meguro i sur., 2005) temelji se na sulfidaciji tkivnog željeza pomoću $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, H_2S ili Na_2S .

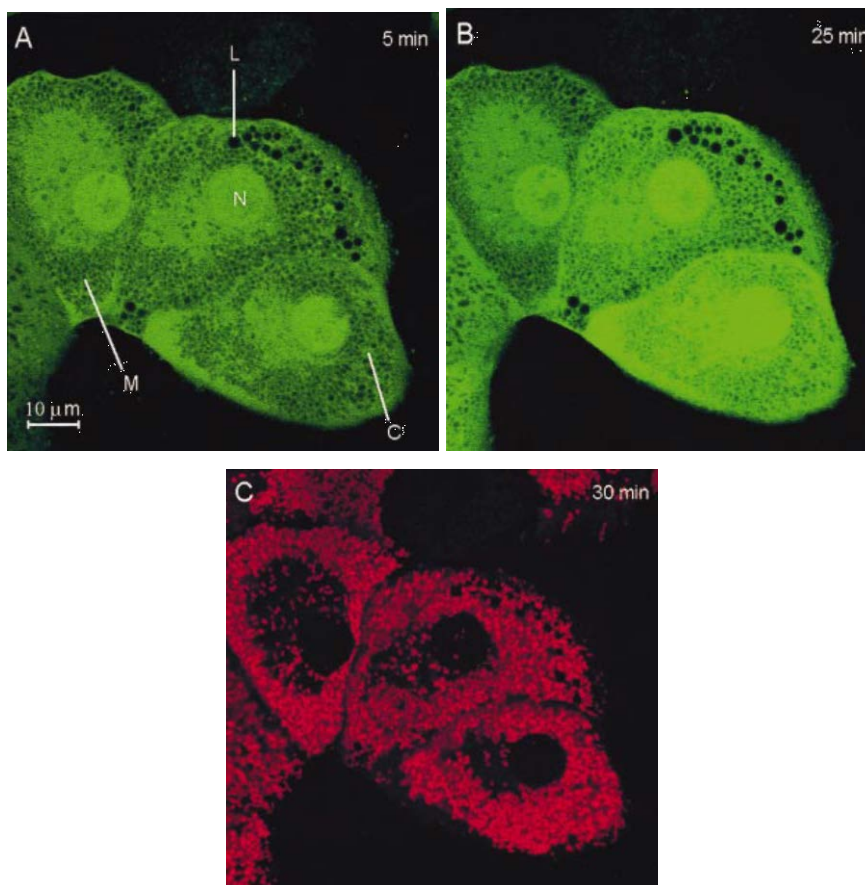


Ovu metodu je opisao Mayer 1850. Nakon tretiranja tkiva sa $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ nastaju crni željezov(II)sulfid (FeS) koji je vrlo pogodan za histološka proučavanja različitim mikroskopijama (svjetlosna i elektronska).

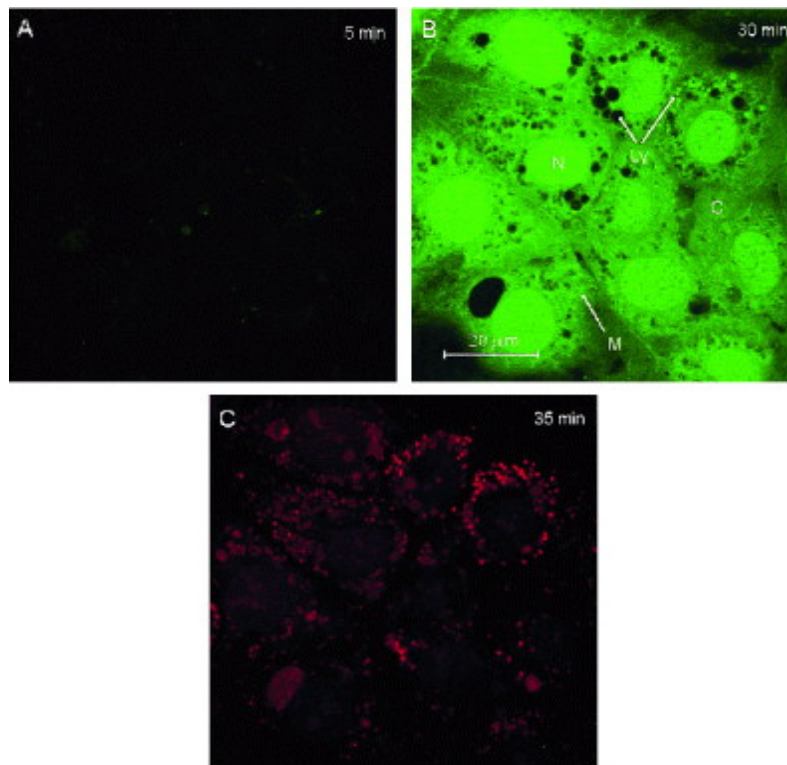
6.4. FLUORESCENTNA HISTOKEMIJA NEHEMSKOG ŽELJEZA

Sve dosad nabrojene metode za histokemijsko dokazivanje željeza većinom su omogućile bolje predočavanje raspodjele željeza u organima i tkivima pomoću svjetlosne i elektronske mikroskopije. No one nam ništa ne govore o količini željeza u tkivu.

Epsztejn i sur. (1997) i Petrat i sur. (2002) razvili su metodu koja omogućuje određivanje količine kelatnog željeza u izoliranim, živim stanicama sisavaca. Ova se metoda zasniva na "gašenju" promijenjivog fluorescentnog indikatora Phen Green SK (PG SK) za metale pomoću unutarstaničnog kelatnog željeza, te "buđenje" njegove fluorescencije dodavanjem jakih kelatora željeza, 2,2'- dipiridil (2,2'-DPD) ili 1,10-fenantrolina (Slika 12. i Slika 13.), u suvišku (Petrat, de Groot i Rauen, 2001). Uz to ustanovljena je i metoda *ex situ* kalibracije koja omogućuje određivanje koncentracije kelatnog željeza direktno iz promjena u apsolutnoj staničnoj fluorescenciji.



Slika 12. "Buđenje" fluorescencije hepatocita tretiranih sa PG SK dodavanjem kelatora željeza (Izvor: www.pubmedcentral.nih.gov)



Slika 13. Raspodjela kelatnog željeza u endotlenim stanicama jetre
(Izvor: www.pubmedcentral.nih.gov)

7. LITERATURA

- Andrews, N.C. and Donovan, A., 2004. The molecular regulation of iron metabolism. *The hematology Journal* **5**, 373-380
- Andrews, N.C. and Schmidt, P.J., 2006. Iron homeostasis. *Annual Review Physiology* **69**, 69-85
- Donovan, A., Roy, C.N. and Andrews, N.C., 2006. The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology* **21**, 115-123
- Kalauz, M. i Premužić, M., 2006. Metaboličke bolesti jetre. *Medicus* **15**, 137-141
- Meguro, R. et al., 2007. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Arch Histol Cytol* **70** (1), 1-19
- Papanikolaou, G. and Pantopulos, K., 2004. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and applied Pharmacology* **202**, 199-211
- Petrat, F., De Grot, H. and Rauen, U., 2001. Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopy study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochemical Journal* **356**, 61-69
- Sharma, N. et al., 2005. The emerging role of the liver in iron metabolism. *American Journal of Gastroenterology* **100**, 201-206
- Siah, C. et al., 2006. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. *Clinical Biochemistry Review* **27**
- www.nature.com/ajg/journal/v100/n1/full/ajg200531a.html
- www.online.haematologica.org/thj/2004/6200540a.pdf
- www.old.aacb.asn.au/pubs/2006%20cbr%20articles/february%20cbr%202006%20siah%20.pdf
- www.scribd.com/doc/17686282/Iron-Homeostasis
- www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1221812&blobtype=pdf
- www.hrcak.srce.hr/file/29351
- www.library.med.utah.edu
- www.physiologyonline.physiology.org
- www.courses.washington.edu
- www.pathologieutrecht.nl

8. SAŽETAK

Željezo je potrebno za osnovno funkcioniranje svih stanica u organizmu sisavaca, ali posebnu važnost ima u stanicama koje proizvode hemoglobin i mioglobin. Sisavci primaju željezo isključivo putem prehrane. Apsorpcija željeza se odvija u proksimalnom dijelu tankog crijeva. Jetra ima veliki kapacitet za pohranu suvišnog željeza. Također ima i regulatornu ulogu u metabolizmu željeza. Specijalizirani makrofazi odstranjuju stare eritrocite iz cirkulacije te imaju ulogu u recikliranju željeza. Hpcidin ima središnju ulogu u regulaciji homeostaze željeza. Postoji nekoliko poremećaja povezanih sa defektnim metabolizmom željeza, npr. hereditarna hemokromatoza, aceruloplazminemija i druge.

Postoji nekoliko histokemijskih metoda za dokazivanje željeza u stanicama, a najčešća je Perlova metoda.

9. SUMMARY

Iron is necessary for the basal functioning of all mammalian cells but is particularly important in cells producing hemoglobin and myoglobin. Mammals obtain iron exclusively from the diet. Iron absorption takes place in the proximal small intestine. Liver has a large capacity to store excess iron. It also plays regulatory role in iron metabolism. Specialized macrophages remove effete red cells from circulation for iron recycling. Hpcidin is the key regulator in iron homeostasis. There are several disorders attached to defect iron metabolism, e.g. hereditary hemochromatosis, aceruloplasminemia e.t.c.

There are several histochemical methods for cellular iron detection and the most common method is Perl's method.